

할구 한 개가 제거된 생쥐 4세포기 수정란의 초급속동결

강만중 · 이철상 · 한용만 · 유대열 · 이경광
한국과학기술연구원 유전공학연구소

Ultrarapid Freezing of Biopsied Mouse Embryos at the 4-cell Stage

M. J. Kang, C. S. Lee, Y. M. Han, D. Y. Yu and K. K. Lee
Genetic Engineering Research Institute, KIST

SUMMARY

Cryopreservation of mouse embryos biopsied at 4-cell stage was investigated by ultrarapid freezing. Four-cell embryos were obtained from ICR mice on 55h after hCG injection. Zona pellucida of the embryos were partially dissected with a cutting pipet, and then single blastomeres were biopsied from the embryos followed by incubation in Ca^{2+} and Mg^{2+} -free M16 medium for 30min. Biopsied embryos cultured for 1h or 15h were frozen by ultrarapid freezing method using 3M DMSO or 5M glycerol as a cryoprotectant, respectively. The developmental rate of biopsied embryos after ultrarapid freezing and thawing to blastocysts was 81% in the group of biopsied embryos cultured for 1h and 98% in the group of biopsied embryos cultured for 15h, respectively. When biopsied embryos after ultrarapid freezing and thawing were transferred to the uteri of pseudopregnant recipients, normal live young were born. These results suggest that this freezing method can efficiently cryopreserve biopsied mouse embryos.

(Key words: ultrarapid freezing, biopsied embryo, cryoprotectant)

서론

포유동물 수정란을 $-196^{\circ}C$ 에서 반영구적으로 보존할 수 있는 수정란 동결보존기술은 실험동물 (Rall과 Fahy, 1985; Kasai 등, 1990; 강 등, 1990) 뿐만 아니라 대가축 (Leibo, 1984, 1978; Voelkel 과 Hu, 1992; Voelkel 등, 1992)에서도 광범위하게 이용되고 있다. 동결에는 주로 완만 동결방법이 이용되어 왔으나 최근에는 수정란을 액체질소에 바로 침지하는 초급속동결방법이 개발되고 있다.

한편, 포유동물 수정란의 미세조작방법이 다양하게 개발되어 형질이 우수한 수정란의 이용 효율을 크게 제고할 수 있게 되었다. 즉, 외래유전자가 주

입된 수정란(Gordon 등, 1980; 이 등, 1989; Ebert 등, 1991), 핵치환된 수정란(McGrath 과 Solter, 1984; Parther 등, 1989), 체외 수정란(Fukuda 등, 1990) 과 할구 제거 및 치환된 수정란(Willadsen, 1986; Prather 등, 1987)으로 부터 산자 생산이 가능하게 되었다. 이러한 수정란의 미세조작기술과 동결보존기술을 연계시킨다면 가축의 생산성을 획기적으로 향상시킬 수 있을 것이다.

미세조작된 수정란을 동결보존하고자 하는 연구는 양분된 수정란(Lehn-Jenson 과 Willadsen, 1983; Tsunoda 등, 1987; Kobayashi 등, 1990) 외래유전자가 주입된 수정란(Petters 등, 1987)과 할구 한 개가 제거된 수정란(Wilton 등, 1989)에서 실시되고 있다.

미세조작방법에 의하여 수정란의 할구 1~2개를 분리한 후 이들 할구를 염색체 또는 유전자 분석에 이용하고 나머지 수정란(biopsied embryo)을 동결 보존하였다가 필요한 시기에 융해하여 이용하게 된다면, 수정란의 이용효율을 더욱 높일 수 있을 것이다. 따라서 본 연구는 할구 한 개가 제거된 생쥐 4세포기 수정란을 대상으로 효율적인 동결 보존 방법을 확립하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 다배란 유기 및 수정란 준비

공시동물은 유전공학연구소 실험동물실로부터 분양받은 교잡종 (C57BL/6×CBA)과 ICR 계통의 생쥐를 사용하였다. 다배란 유기를 위하여 PMSG(제국장기, 일본)와 hCG(Sigma, USA)를 48시간 간격으로 각각 5IU 씩 자성 생쥐의 복강내에 주사한 다음, 동일계통의 웅성 생쥐와 1:1로 합사시켜 자연교미를 유도하였으며, 다음날 아침 질전이 확인된 개체만을 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 4세포기 수정란은 hCG 주사 후 55시간에 생쥐의 난관으로부터 회수하였다.

2. 4세포기 수정란의 biopsy

4세포기 수정란의 biopsy는 미세조작기를 이용하여 다음과 같이 실시하였다. ICR 생쥐의 4세포기 수정란을 silicon oil(Sigma, USA)이 피복되어 있는 미세조작용 slide glass 위의 M2 소적(5 μ)에 옮겨 DIC(Differential Interference Contrast) system을 갖추고 있는 inverted microscope(Leitz)하에서 200배로 관찰하면서 미세조작기(Leitz)를 사용하여 일부의 투명대를 절개하였다.

Fig. 1의 B와 C에서 보는 바와 같이 수정란의 한쪽을 고정용 피펫으로 흡입하여 고정하고, 투명대 절개용 피펫을 할구에 손상을 주지 않도록 투명대와 할구 사이로 찢어 넣는다. 그 다음 수정란의 고정을 풀고 수정란을 투명대 절개용 피펫에 끼운채, 고정용 피펫의 아랫면에 접촉시킨 다음 고정용 피펫을 문질러 투명대의 일부를 절개하였다(Fig. 1의 D). 이렇게 투명대가 절개된 수정란을 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 없는 M16 배양액에서 30분간 배양을 실시하였다.

배양이 끝난 수정란을 미세조작용 slide glass 위의 embryo biopsy medium(Gordon and Gang, 1990)에 옮기고, 200배의 현미경하에서 수정란을 고정용 피펫으로 고정한 후 직경 10~15 μ m의 할구 제거용 피펫을 투명대의 절개부위로 삽입하여 하나의 할구를 흡입 제거하였다(Fig. 2). 하나의 할구가 제거된 수정란 즉, biopsy된 수정란은 M2 배지로 수회 세척 후 M16 배양액에서 1시간 또는 15시간 동안 배양한 다음 동결을 실시하였다.

3. 수정란의 동결 및 융해

수정란 동결에 사용한 동결보존액은 아래와 같이 두 가지로 구분 제조하였다.

동결보존액 I : 3mg/ml의 BSA(bovine serum albumin, Sigma, USA)를 함유하고 있는 PBS(modified Dulbecco's phosphate buffered saline) 용액에 DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma, USA), sucrose 및 FBS(fetal bovine serum, Gibco, USA)의 최종농도가 각각 3M, 0.25M 및 20%가 되도록 제조하였다.

동결보존액 II : 6mg/ml의 BSA를 함유하고 있는 PBS 용액에 glycerol과 sucrose의 최종농도가 각각 5M 및 0.25M이 되도록 제조하였다. 동결보존액 I은 4세포기 수정란을 biopsy한 다음 1시간 배양 후 동결할 때 사용하였으며, 동결보존액 II는 biopsy한 후 15시간 배양하여 초기상실배까지 발달시킨 수정란을 동결할 때 사용하였다. 수정란 동결은 상기 동결보존액을 이용하여 초급속동결방법으로 실시하였다. 즉 준비된 수정란을 PBS(50 μ l)로 3회 세척하고 25 μ l의 동결보존액으로 1회 세척한 다음 동결보존액이 들어있는 0.25ml straw에 옮겨 2.5~3분간 평형시킨 후, straw를 곧바로 액체질소(-196 $^{\circ}$ C)에 침지함으로써 초급속 동결을 실시하였다.

동결보존된 수정란의 융해는 straw를 실온에서 40초간 방치한 다음 37 $^{\circ}$ C 온수에서 30초간 천천히 흔들어서 실시하였다. 융해 후 straw내의 내용물을 0.5ml의 희석액(0.25M sucrose + PBS)으로 모두 방출시킨 다음, 수정란을 다시 새로운 0.5ml의 희석액에 옮겨 수정란내의 내용물을 제거하였으며 희석시간은 10분이었다. 희석이 끝난 수정란을 신선한 PBS(50 μ l) 용액으로 3회 반복하여 세척하고 다

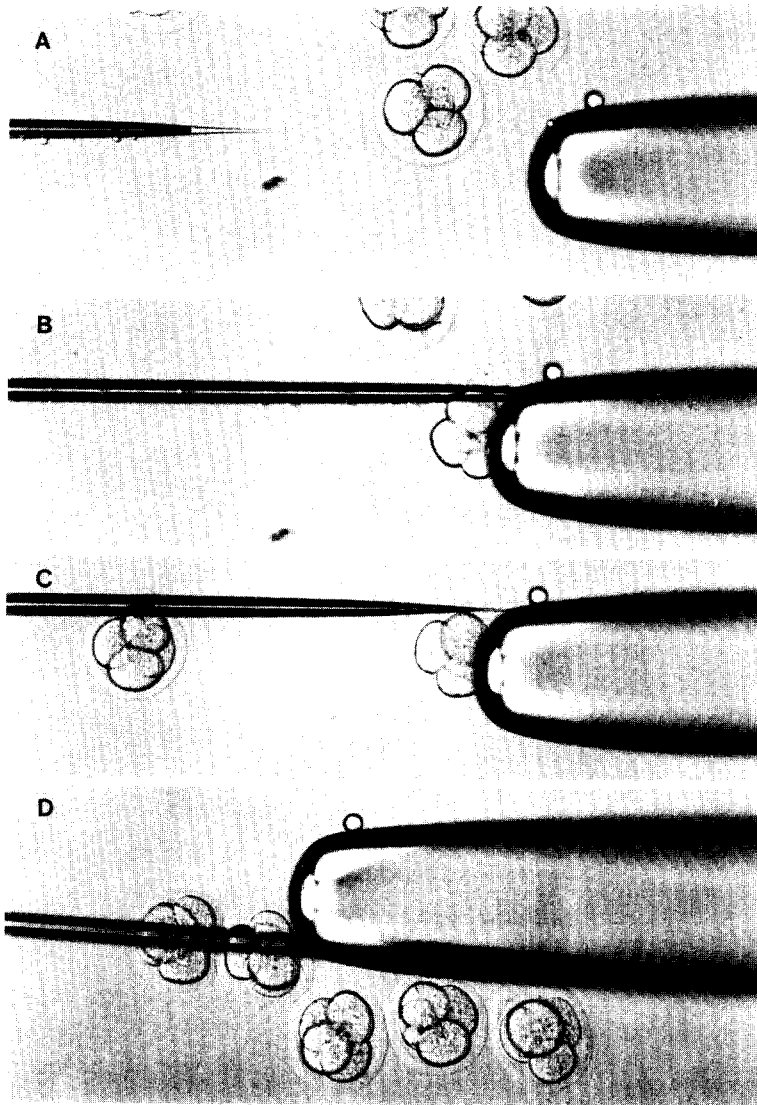


Fig. 1. Zona cutting of mouse 4-cell embryos($\times 200$).

시 한번 PBS 용액에서 5분간 방치한 다음 M16 배양액으로 옮겨 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 체외배양 하였다.

4. 수정란 배양

본 실험에 사용된 배양액은 0.4% BSA와 100 μ M의 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma, USA)가 함유된 M16 배양액(Whittingham, 1971)을 사용하였으며, 체외배양을 위하여 petri

dish(Falcon, USA)에 50 μ l의 배양액 소적을 만들어 heavy mineral oil(Sigma, USA)로 피복한 다음, 37℃, 5% CO₂ 배양기 내에서 최소한 2시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

5. 수정란 이식

수정란 이식은 biopsy한 다음 1시간 후에 동결 용해한 수정란은 48~50시간, biopsy후 15시간 배양하여 상실배기에서 동결 용해한 수정란은 24~30

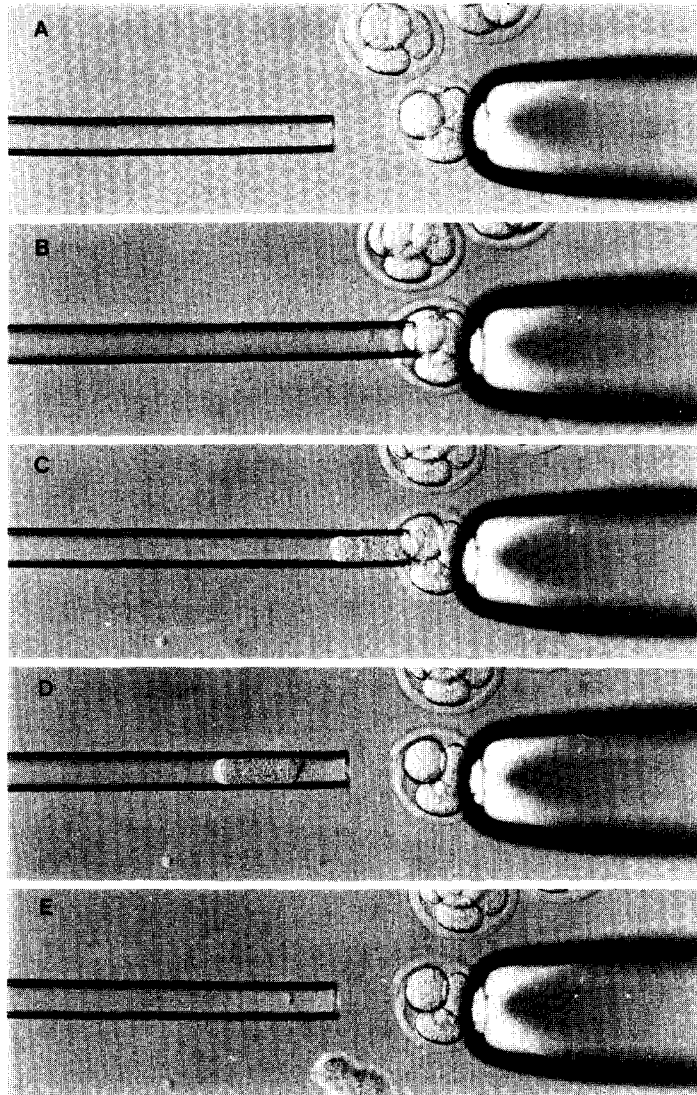


Fig. 2. Biopsy of mouse 4-cell embryos after incubation with Ca^{2+} and Mg^{2+} -free M16 for 30 minute.

시간 체외배양하여 배반포기까지 발달시킨 다음 가임신이 유도된 ICR 생쥐의 자궁에 이식하였다. 먼저 가임신 3일째의 ICR 생쥐에 체중 10g당 0.5mg의 마취제(Somnopenyl: Pitman-Moore, USA)를 복강내에 주사하여 전신마취를 실시하였다. 마취된 생쥐의 배측 정중선을 약 1cm 정도 절개하고 난소, 난관, 자궁을 들어내어 각각의 자궁에 6~10개의 배반포기 배를 이식한 다음 근육층과 표피를 봉합하였다. 그리고 이들 생쥐들의 임신 여부 및 산

자수 등을 조사하였다.

결과 및 고찰

Biopsy한 생쥐 4세포기 수정란의 체외발달 성적은 Table 1에서 보는 바와 같다. Biopsy한 105개의 생쥐 수정란을 72시간동안 체외배양한 결과 95%가 배반포기까지 발달하였는데, 이는 정상적인 4세포기 수정란을 배양한 대조구의 성적(99%)과 유사하

Table 1. *In vitro* development of biopsied 4-cell mouse embryos

	No. of embryos tested	No. of embryos developed to blastocysts(%)
Biopsied	105	100(95)
Intact	112	111(99)

였다. 이러한 결과는 Wilton과 Trounson(1989)이 보고한 biopsy된 4 세포기 생쥐 수정란의 체외발달율(94.4%)과 유사하였다. 그리고 대조구 수정란의 체외발달율과 차이가 없으므로 본 실험에서 사용한 biopsy방법은 수정란의 체외발달에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

Table 2는 3M DMSO를 이용하여 biopsy한 수정란을 4 세포기에서 초급속 동결 용해한 후의 체외 발달 및 이식 성적이다. 본 연구실에서는 4 세포기 수정란의 초급속동결에 대한 기초 실험으로 DMSO 농도(3, 4, 5M)를 비교한 결과 3M에서 가장 양호한 체외발달율(76%)을 얻었다(자료 미제출). 따라서 본 연구에서도 동일한 농도의 DMSO를 사용하여 biopsy후 한 시간 배양한 4 세포기 수정란을 대상으로 동결 실험을 실시하였다. 4 세포기 수정란을 biopsy한 다음 1시간 배양한 후 3M DMSO를 내동제로하여 동결한 결과 수정란의 회수율은 98%로서 정상적인 4 세포기 수정란을 동결한 대조구의 성적(96%)과 차이가 없었다.

그리고 회수된 수정란 중 정상적인 수정란의 비율은 각각 81%와 74%였으며, 배반포기 배까지의 발달율은 각각 81%와 73%를 나타내었다. 그리고

용해 후 배반포기까지 발달한 43개의 biopsy 된 수정란을 이식한 결과 7마리의 산자(16%)를 얻었으며, 이는 정상적인 4세포기 수정란을 동결 용해한 후 이식한 대조구의 성적(15%)과 유사하였다. Wilton 등(1989)은 내동제로서 4.5M DMSO를 이용하여 biopsy된 4세포기 수정란을 동결하였을 때, 50%의 할구가 생존한 것을 기준으로 하여 용해후 100%의 수정란이 회수되었으며, 이들을 40시간 동안 배양한 결과 94.9%가 정상적인 형태를 보였다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 동결 용해 후 모든 할구가 정상인 수정란만을 생존한 것으로 판정하였고 또한 이들을 72시간 동안 배양하였기 때문에 Wilton 등(1989)의 보고와 다소 차이가 있을 수 있다.

5M glycerol을 이용하여 biopsy된 4 세포기 수정란을 상실배기 단계에서 초급속동결 용해한 결과는 Table 3과 같다. 본 연구실에서는 생쥐 상실배기 수정란의 초급속동결에 있어 glycerol농도의 영향을 1M에서 5M까지 조사한 결과 5M glycerol에서 가장 우수한 체외발달율(93%)을 얻었다(자료 미제출). 따라서 본 연구에서도 5M glycerol을 사용하여 biopsy된 수정란의 동결을 실시하였다.

Table 2. *In vitro* and *in vivo* viability of biopsied mouse embryos frozen at 4-cell stage by ultrarapid freezing using 3M DMSO

Manipulation	No. of embryos			No. embryos developed to blastocysts ^c	No. embryos transferred	No. pregnant / No. recipient	Young
	Frozen	Recovered ^a	Normal ^b				
Biopsied	81	80(98)	65(81)	53(81)	43	2/5	7(16)
Intact	85	82(96)	61(74)	45(73)	40	1/5	6(15)

Percentage of embryos in parentheses.

^aNo. of embryos recovered / No. of embryos frozen × 100

^bNo. of normal embryos post-thawing / No. of embryos recovered × 100

^cNo. of blastocysts / No. of embryos post-thawing × 100

Table 3. *In vitro* and *in vivo* viability of biopsied mouse embryos frozen at morula stage by ultrarapid freezing using 5M glycerol

Manipulation	No. of embryos			No. embryos developed to blastocysts ^c	No. embryos transferred	No. pregnant / No. recipient	Young
	Frozen	Recovered ^a	Normal ^b				
Biopsied	90	90(100)	88(97)	87(98)	50	3/5	17(34)
Intact	89	89(100)	86(96)	86(100)	51	5/5	25(49)

Percentage of embryos in parentheses.

^aNo. of embryos recovered / No. of embryos frozen×100

^bNo. of normal embryos post-thawing / No. of embryos recovered×100

^cNo. of blastocysts / No. of embryos post-thawing×100

Biopsy된 수정란을 15시간 배양한 다음 상실배기에서 5M glycerol을 이용하여 동결했을 때 용해 후 회수율, 회수된 수정란 중 정상적인 수정란 및 배반포기까지의 발달율은 각각 100%, 97% 및 98%로서 biopsy하지 않은 수정란을 동결한 대조구의 성적과 거의 일치하였다. 그리고 배반포기까지 발달한 수정란을 이식하였을 때 biopsy된 수정란에서 34%, 정상적인 수정란을 동결 용해한 후 이식한 대조구에서는 49%의 산자율을 얻었다.

본 실험의 체외발달성적은 상실배에서 vitrification 방법으로 동결을 실시한 Kasai 등(1990)의 성적(97~98%), 초급속동결을 실시한 Szell 과 Shelton (1987)의 성적(90~95%)과도 유사한 성적이었다. 또한 수정란 동결은 상실배에서 동결하는 것이 가장 좋은 것으로 보고되고 있다(Kono 와 Tsunoda, 1987; Smorage 등, 1989; 강 등, 1989).

따라서 이상의 결과를 종합하여 본 때 biopsy된 생쥐 4세포기 수정란의 동결보존은 biopsy후 15시간 배양한 다음 상실배기에서 5M glycerol을 이용하여 초급속동결하는 것이 체외발달 및 개체발생에 있어서 더욱 효과적인 방법이라고 할 수 있다.

결 론

본 연구는 활구 한 개를 제거한 4 세포기 수정란 (biopsied embryo)의 초급속 동결보존 가능성을 검토하기 위하여 실시하였다.

4세포기 수정란의 활구 한 개를 제거한 후, 1시간 배양한 다음 3M DMSO를 이용하여 초급속 동결 용해 후 체외배양한 결과 81%가 배반포기배까지

발달하였으며, 15시간 배양 후 상실배에서 동결 용해한 처리구에서는 98%의 체외발달율을 얻었다. 후자의 결과는 4세포기 수정란의 활구 한 개를 제거한 후 동결하지 않고 체외배양한 대조구의 성적(95%)과 유사하였으며, 또한 미세조작하지 않은 수정란을 초급속 동결용해한 성적(100%)과 차이가 없었다. 그리고 동결용해한 이들 수정란을 가임신이 유도된 생쥐에 이식하여 16~49%의 산자율을 얻었다. 이러한 결과는 초급속 동결 방법으로 활구 한 개가 제거된 생쥐수정란을 동결 보존할 수 있다는 사실을 입증하고 있다.

참고문헌

- Ebert KM, Selgrath JP, Ditullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA and Gordon K. 1991. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: Generation of transgenic goats and analysis of expression. *Bio/Tech-nology*, 9: 835-838.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K and Toyoda Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cell *in vitro* upto the blastocyst stage. *Biol. Reprod.* 42: 114-119.
- Gordon JW and Gang I. 1990. Use of zona drilling for safe and effective biopsy of murine oocytes and embryos. *Biol. Reprod.*, 42:

- 869-876.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA and Ruddle FH. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 7380-7384.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T and Machida T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.*, 89: 91-97.
- Kobayashi K, Nagashima H, Yamakawa H, Kato Y and Ogawa S. 1990. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. *Theriogenology*, 33: 777-788.
- Kono T and Tsunoda Y. 1987. Frozen storage of mouse embryos by vitrification. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 33: 77-81.
- Lehn-Jensen H and Willadsen SM. 1983. Deep-freezing of cow 'HALF' and 'QUARTER' embryos. *Theriogenology*, 19: 49-54.
- Leibo SP. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21: 767-790.
- McGrath J and Solter D. 1984. Viability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development *in vitro*. *Science*, 226: 1317-1319.
- Petters RM, Johnson BH and Mercer WE. 1987. Production of transgenic mice following deoxyribonucleic acid microinjection and embryo freezing. *Theriogenology*, 27: 507-515.
- Prather RS, Sims MM and First NL. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.*, 41: 414-418.
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH and First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37: 859-866.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313: 573-575.
- Smorage Z, Gajda B, Viecezorek B and Jura J. 1989. Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 31: 1227-1231.
- Szell A and Shelton JN. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on Day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 80: 309-316.
- Tsunoda Y, Tokunaga T, Okubo Y and Sugie T. 1987. Beneficial effect of agar for the frozen storage of bisected embryos. *Theriogenology*, 28:317-322.
- Voelkel SA and Hu YX. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 37: 23-37.
- Voelkel SA, Hu YX, Moore K and Bondioli KR. 1992. Freezing survival of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and culture of oocytes. *Theriogenology*, 37: 317.
- Whittingham DG. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, 14, suppl: 7-21.
- Wilton LJ and Trounson AO. 1989. Biopsy of preimplantation mouse embryos: development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 40: 145-152.
- Wilton LT, Shaw JM and Trounson AO. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fert. Steril.*, 51: 513-517.
- Willadson SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320: 63-65.
- 강만중, 김영훈, 문성호, 김중제. 1989. Mouse 수정란의 급속동결에 있어서 수정란의 발육단계와

식병이 생존율에 미치는 영향. 한국가축면역학회지, 13: 141-148.

이경광, 한용만, 남궁 욱, 이철상, 김용주, 김재만, 김지영, 한문희. 1989. 생쥐에 있어서 사람 상호호르몬 유전자의 발현. 한축지, 31: 139-147.